

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.02.008

引用格式:马诗睿,于正发,喻启坤,等.狗牙根WRKY基因家族鉴定及碱性盐胁迫下表达分析[J].草地学报,2026,34(2):456—468

MA Shi-rui, YU Zheng-fa, YU Qi-kun, et al. Identification of WRKY Family Genes and Expression Analysis under Alkaline Salt Stress in Bermudagrass[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(2):456—468

狗牙根WRKY基因家族鉴定及碱性盐胁迫下表达分析

马诗睿¹, 于正发¹, 喻启坤¹, 于瑞¹, 朱莉莉¹, 张志扬¹, 李培英^{1,2,3*}

(1. 新疆农业大学草业学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆草地资源与生态自治区重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052; 3. 西部干旱区草地资源与生态教育部重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:本研究基于狗牙根(*Cynodon dactylon*)基因组数据,采用生物信息学方法对其WRKY基因家族成员进行鉴定,同时基于转录组数据分析其在碱性盐胁迫下的表达模式。结果显示,狗牙根基因组中共鉴定出129个WRKY转录因子,根据其在染色体上的位置进行命名。通过与拟南芥WRKY蛋白比对进行系统发育分析,将上述转录因子分为I、II、III共3个族,其不均匀分布在狗牙根18条染色体上,其中7号染色体的数量最多(22个)。共线性分析表明,片段复制主要驱动了狗牙根*CdWRKYs*的进化。基于转录组数据,筛选出11个碱性盐胁迫下差异表达的*CdWRKYs*,经qRT-PCR分析表明,推测*CdWRKY59*、*CdWRKY81*、*CdWRKY113*与*CdWRKY126*可能在狗牙根碱性盐胁迫耐受中具有重要作用。本研究结果可为WRKY基因家族的进一步功能分析奠定基础。

关键词:狗牙根;WRKY转录因子;全基因组鉴定;碱性盐胁迫;表达模式

中图分类号:Q943.2

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)02-0456-13

Identification of WRKY Family Genes and Expression Analysis under Alkaline Salt Stress in Bermudagrass

MA Shi-rui¹, YU Zheng-fa¹, YU Qi-kun¹, YU Rui¹, ZHU Li-li¹, ZHANG Zhi-yang¹, LI Pei-ying^{1,2,3*}

(1. College of Grassland science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology, Urumqi, Xinjiang 830052, China; 3. Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology of the Ministry of Education of the Western Arid Zone, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: Bermudagrass has important application value in landscaping and ecological restoration because of its strong drought resistance, saline-alkali resistance, and developed rhizomes and stolons. However, the molecular mechanism of its response to alkaline salt stress is still unclear. The WRKY gene family plays an important role in plant growth, development and defense against biotic and abiotic stresses, but it has not been fully identified in bermudagrass. Therefore, based on genomic data, this study systematically identified the physical and chemical properties, chromosome distribution, cis-acting elements, gene structure, conserved motifs and phylogenetic trees of WRKY gene family members in bermudagrass. At the same time, based on transcriptome data, the expression pattern of its family members under alkaline salt stress was analyzed. The results showed that 129 WRKY transcription factors were identified in the bermudagrass genome and named according to their location on the chromosome. Phylogenetic analysis was carried out by comparing with Arabidopsis WRKY protein, and the above transcription factors were divided into three families: I, II and III, which were unevenly distributed on 18 chromosomes with the largest number of chromosomes 7 (22). Collinearity analysis showed that fragment replication mainly drove the evolution of *CdWRKYs* in bermudagrass. Based on the transcrip-

收稿日期:2025-04-30;修回日期:2025-08-02

基金项目:国家自然科学基金(32260341);新疆维吾尔自治区重点研发项目(2023B02031-1)资助

作者简介:马诗睿(2001-),女,汉族,新疆昌吉人,硕士研究生,主要从事草种抗性分析机制研究,E-mail: 1529837814@qq.com; *通信作者 Aauthor for correspondence, E-mail: lpy@xjau.edu.cn

tome data, 11 differentially expressed *CdWRKYs* under alkaline salt stress were screened out. The qRT-PCR analysis showed that the expression levels of *CdWRKY59*, *CdWRKY81*, *CdWRKY113* and *CdWRKY126* reached the peak at 3 h, and their expression folds were 99.6-312.3 times than the control. It is speculated that these WRKY family members might play an important role in alkaline salt stress tolerance. The results of this study analyzed the role of WRKY genes in the response of bermudagrass to alkaline salt stress, and laid a foundation for further functional analysis of WRKY gene family.

Key words: Bermudagrass; WRKY transcription factor; Genome-wide identification; Alkaline salt stress; Expressive mode

狗牙根(*Cynodon dactylon*)隶属禾本科狗牙根属。因其植株低矮,质地细腻,草层厚密、色泽佳,根茎与匍匐茎发达,繁殖迅速、成坪快且耐践踏,是国内外较温暖地区用于建植运动场、公园绿化以及固土护坡等草坪的常用草种之一^[1-2]。狗牙根是全球广布物种,分布于北纬45°至南纬45°之间^[3]。在长期适应不同环境过程中逐渐演化出多种生态类型,使其成为研究逆境胁迫的优质材料^[4]。新疆是我国盐碱地分布面积最广的地区,盐渍化土壤总面积达1336.1万hm²,占全国盐渍化土壤总面积的36.8%^[5]。狗牙根在新疆广泛分布,调查显示,其在pH值为9.3的重盐碱土上也能良好生长^[2],在盐碱地绿化与生态修复方面极具应用潜力^[6]。然而,目前关于狗牙根抗碱性盐的分子机制研究相对匮乏。

WRKY转录因子于1994年首次从甘薯(*Dioscorea esculenta*)基因组中被分离出来并命名为SPF1^[7]。WRKY家族成员在结构上具有高度保守的WRKY结构域,其N端为WRKYGOK保守序列,C端为C2H2型或C2HC型锌指结构序列^[8],可以根据WRKY结构域的数量及其锌指状基序的特征对WRKY转录因子家族成员进行分类,具有两个WRKY结构域的WRKY成员属于I组,具有一个WRKY结构域的多数WRKY成员属于II组,而具有一个WRKY结构域且其锌指结构为C2HC型的成员属于III组;其中II组WRKY成员由于氨基酸序列的差异可进一步分为II-a、II-b、II-c、II-d和II-e共5个亚类^[8-9]。

WRKY是植物特异转录因子家族,其家族成员众多,功能多样,可以调控植物生长发育、响应多种胁迫(如盐、干旱、病原菌等),在抵御盐胁迫过程中具有重要作用^[10]。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)中过表达*MsWRKY11*基因可以通过调节细胞内离子稳态和保护过氧化物酶活性,提高紫花苜蓿的耐盐能力^[11];小麦(*Triticum aestivum*)WRKY转录因子*TaWRKY17*在各种器官中差异表达,并且盐胁迫下显著上调表达^[12]。水稻(*Oryza sativa*)中过表达

*OsWRKY50*已被证明可增加转基因植物的耐盐性,从而影响种子发芽和幼苗建成^[13]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)过表达盐诱导*CdWRKY2*基因可以通过调控生长素稳态和ABA信号相关基因负向调节侧根生长^[14]。*CdWRKY50*通过减少盐诱导基因的过度表达来平衡植物对盐胁迫的反应和维持基础代谢的需要,是一个介导植物对盐胁迫反应的负调控因子,其在盐、干旱、寒冷和脱落酸处理下表达上调,沉默*CdWRKY50*表达可增强狗牙根的耐盐性^[15]。为进一步探讨狗牙根WRKY基因家族在碱性盐胁迫中的作用,本文拟基于狗牙根全基因组挖掘与耐碱性盐相关的关键WRKY转录因子,为下一步基因克隆、明确其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 *CdWRKYs* 基因家族鉴定与染色体分布

参考狗牙根基因组相关文献,在国家基因组科学数据中心(<https://bigd.big.ac.cn/gwh>)下载狗牙根基因组序列、蛋白序列及基因组注释文件(项目编号:PRJCA019991)。拟南芥全基因组数据来自在线网站(<https://www.arabidopsis.org/>)。根据拟南芥数据库查找WRKY基因家族蛋白质序列,并以其蛋白序列为模板在Pfam数据库(<https://pfam.xfam.org/>)进行检索,下载WRKY蛋白的保守结构域(PF03106)文件,执行hmm search命令,其中Evalue≤e-10。使用默认参数CD-Hit值0.01删除冗余序列。根据狗牙根基因组注释文件,通过TBtools^[16]对*CdWRKYs*家族基因的染色体分布进行可视化。

1.2 *CdWRKYs* 基因家族成员理化性质分析

通过ExPASy(<https://www.expasy.org/>)对*CdWRKYs*家族成员氨基酸长度、蛋白质分子量、等电点等进行分析。利用WoLF PSORT(<https://wolfsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位预测。

1.3 *CdWRKYs* 基因家族成员的系统进化分析

利用 MEGA11 软件对拟南芥和狗牙根的 WRKY 蛋白序列进行多序列比对,并基于邻接法(NJ)构建进化树 Bootstrap 值设置为 1000 次重复,使用在线网站 iTOL(<https://itol.embl.de/>)进行美化。

1.4 *CdWRKYs* 基因家族成员的 motif、基因结构分析

使用在线 MEME 工具(<https://meme-suite.org/meme/>)检测保守基序。保守序列的最大鉴定数目设置为 10。将所有鉴定到的 *CdWRKYs* 基因通过 NCBI CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)检查它们是否包含完整的 *CdWRKYs* 保守域。为了确定 *CdWRKYs* 基因的外显子和内含子的结构,利用 TBtools 软件进行可视化。

1.5 *CdWRKYs* 基因家族成员的共线性分析

通过 TBtools 软件中的 One Step MCScanX 分析狗牙根基因组内 *CdWRKYs* 基因家族成员间复制关系^[17],通过 Advance Circos 模块对复制关系进行展示,并对拟南芥、水稻与狗牙根基因重复序列进行共线性分析并可视化呈现。

1.6 *CdWRKYs* 基因家族成员的启动子顺式作用元件分析

用 TBtools 提取 *CdWRKYs* 基因上游启动子 2000 bp 的碱基序列上传到 Plant CARE^[18](<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)网站对 *CdWRKYs* 基因的启动子顺式作用元件进行预测分析, TBtools 进行可视化。

1.7 *CdWRKYs* 的表达模式分析

利用课题组前期构建的 2 份狗牙根种质碱性盐胁迫下根系转录组数据,绘制 *CdWRKYs* 基因的表达量热图,并进行 GO 富集分析。

1.8 实验材料及培养条件

以课题组筛选获得的抗碱型 C14 和敏感型 C40 狗牙根为试验材料^[19]。剪取供试材料当年新生匍匐茎,长度约 5 cm,将其移栽至口径为 12 cm 的花盆中。每盆装 750 g 基质,营养土与蛭石 3:1 混合,每盆移栽 10 根匍匐茎。将花盆置于温室培养,温室湿度为 33%~58%,温度为 25℃~35℃。苗龄达 45 d

时,挑选生长一致的狗牙根植株,移至 1/2 霍格兰德营养液中进行缓苗。待其生长至 8~10 叶期时,开展碱胁迫试验。试验设置 3 个处理组,分别为:试验设置 3 个处理,分别是 CK(蒸馏水, pH 值为 7.0), MS (100 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, pH 值为 8.4), SA (100 mmol·L⁻¹ NaHCO₃:Na₂CO₃ 的比例为 1:1, pH 值为 9.9),每个处理 3 次重复。胁迫处理 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、72 h,采集叶片放入液氮中速冻,之后保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.9 实时荧光定量 PCR 与高差异表达 WRKY 基因同源比对

基于狗牙根耐碱转录组测序数据,以 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 $q\text{-value} < 0.05$ 为筛选标准,通过 DEGseq 筛选差异表达基因(DEG),并进行热图展示。挑选碱性盐处理后表达显著上调或下调的 *CdWRKYs* 基因使用生工网站设计引物(表 1),以 EF1 α 为内参基因进行 qRT-PCR 验证^[20]。采用福际(FOREGENE)植物 RNA 提取试剂盒提取植物总 RNA,利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计检测 RNA 质量。使用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。依据福际(FOREGENE)试剂盒说明书,配置 20 μ L 的 qRT-PCR 反应体系。反应程序为:95℃预变性 3 min,后进行 40 个循环的 PCR 扩增(95℃变性 10 s、60℃退火 10 s、72℃延伸 20 s)。设置生物学重复、技术重复各 3 次。运用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算基因相对表达量。利用 SPSS 软件进行方差分析,使用 Origin2022 绘制图表,将筛选出的高差异表达 WRKY 基因序列与拟南芥、水稻的相关基因进行同源序列比对。

2 结果与分析

2.1 *CdWRKYs* 基因家族鉴定与染色体分布

利用 WRKY 结构域的隐马尔可夫模型(HMM)搜索 *CdWRKYs*,共发现 129 个候选基因。根据其在染色体上的位置命名为 *CdWRKY* 1~*CdWRKY*129(图 1)。结果表明,129 个 *CdWRKYs* 基因不均匀地分布在狗牙根 18 条染色体上,其中 Chr3A 染色体上的 *CdWRKYs* 基因数量最多(22 个),其次为 Chr3B 染色体(16 个),而 9B 染色体上最少(仅 1 个),Chr1A、Chr2A、Chr4B、Chr8B 染色体上分别有 4、9、6、8 个。同时,在狗牙根的染

表 1 *CdWRKYs* 基因的 qRT-PCR 引物
Table 1 QRT-PCR primers of *CdWRKYs* gene

基因名称 Gene name	正向引物(5' to 3') Forward primer(5' to 3')	反向引物(3' to 5') Reverse primer(3' to 5')
<i>CdWRKY5</i>	CGCTGCCGACTTCTTCGACTTC	CACCAATCCGCCACTATCCATCAG
<i>CdWRKY9</i>	CGACGCAGCACGACGGAAG	CGCCACCTCTGCTTGCTTCTG
<i>CdWRKY19</i>	TGCCGTGCTCCATCTTCATCAAC	TGCTACCATATCGCCAACAACCG
<i>CdWRKY53</i>	AAGTGCGGCGTGAAGAAGCG	GGACTGTGGTGCGTGTGCTG
<i>CdWRKY59</i>	ACGACGGCACC GAAGACCTC	GGACGACGACGACGACGACCTCTC
<i>CdWRKY63</i>	TCACGGTGGTAGCGGTAGCG	GGAACGAGCGAGATGACGAAAGC
<i>CdWRKY80</i>	GAACCCAGAACTCGTCGGTCAAC	CGCAGTGCTGGTTCGTACTTG TG
<i>CdWRKY81</i>	AGCAACAACAACAGCAACACCAAG	GACCGCTCCACCTTCTTCTTCATG
<i>CdWRKY100</i>	AAGTGCGGCGTGAAGAAGCG	GGACTGTGGTGCGTGTGCTG
<i>CdWRKY113</i>	ACGCCCTCGGTATGCCTTCC	GCCTTCTGTCCGTACTTTCTCCAC
<i>CdWRKY126</i>	GAGGTGACAAGGCACTCGAATCTG	TTGAACAGGAACCGCAGCAGAAG
内参基因 <i>EF1α</i>	TGTCCCTGTCGGTCGTGTT	AGCCTCATGGTGCATCTCA

色体组内发现 23 个串联基因簇,其中,Chr3A 染色体上有 5 个串联基因簇;Chr2A, Chr2B, Chr3B, Chr4A, Chr5A 和 Chr5B 染色体上分别有 3,1,3,2,2,3 个串联基因簇。

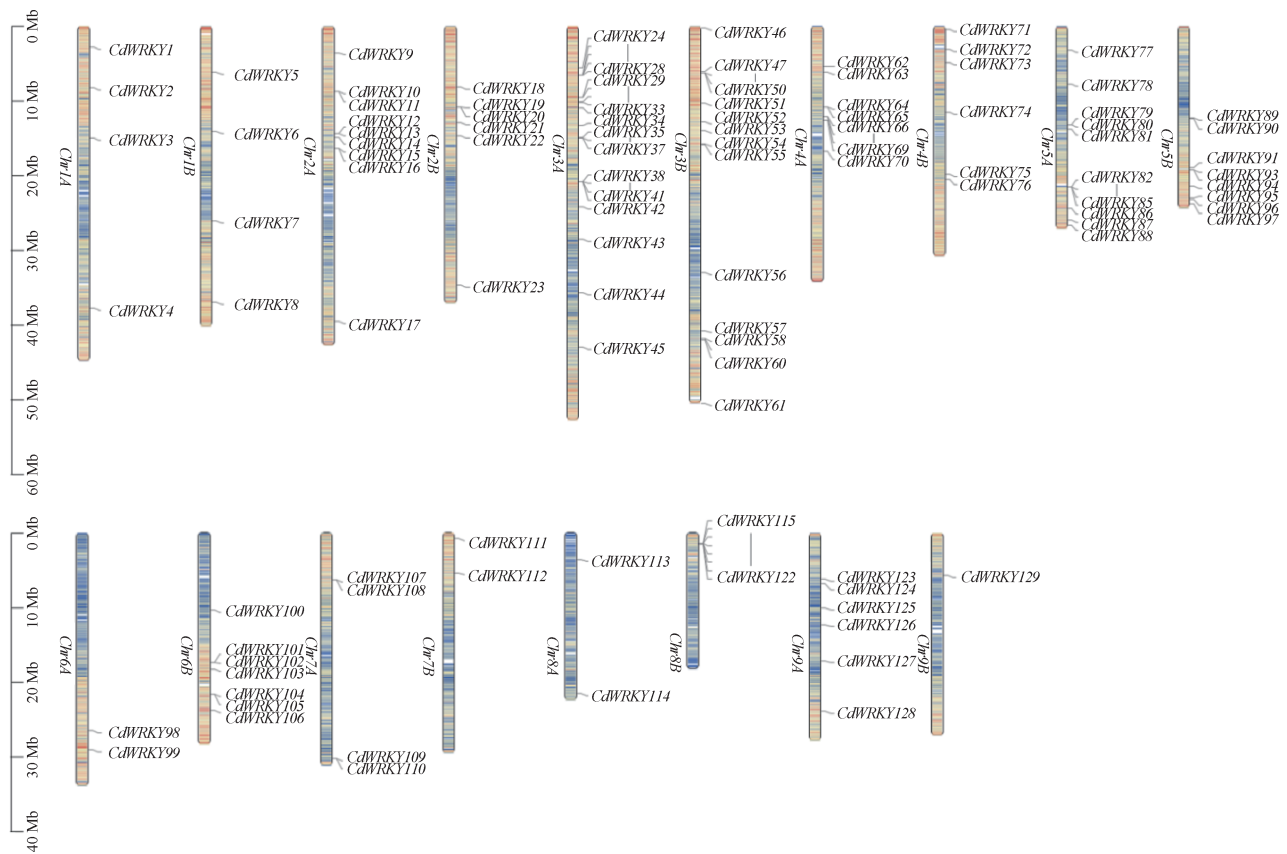


图 1 *CdWRKYs* 基因家族成员的染色体分布

Fig. 1 Chromosomal distribution of *CdWRKYs* gene family members

2.2 *CdWRKYs* 基因家族的生理生化分析

对狗牙根 WRKY 家族成员进行生理生化分析,发现 129 个 WRKY 蛋白的长度为 81~782 个氨基酸,其蛋白质分子量为 85.36~90.34。等电点在 4.71~10.59 之间,其中 53 个 *CdWRKYs* 基因家族成员等电

点超过 7,属于碱性蛋白。亚细胞定位预测显示,103 个 *CdWRKYs* 成员位于细胞核,2 个 *CdWRKYs* 在内质网,6 个 *CdWRKYs* 在过氧化物酶体,4 个 *CdWRKYs* 在细胞质,3 个 *CdWRKYs* 在线粒体,11 个 *CdWRKYs* 在叶绿体。具体 *CdWRKYs* 蛋白的信息见表 2。

表2 *CdWRKYs* 转录因子家族成员信息Table 2 *CdWRKYs* transcription factor family members information

转录本名称 Gene name	基因名 Gene ID	PL/ aa	Mw/ kDa	PI	SI	转录本名称 Gene name	基因名 Gene ID	PL/ aa	Mw/ kDa	PI	SI
rna-Chr1A_Cda11865.1	<i>CdWRKY1</i>	560	60.05	5.36	Nucl	rna-Chr4A_Cda20735.3	<i>CdWRKY66</i>	312	35.39	8.70	Pero
rna-Chr1A_Cda12582.1	<i>CdWRKY2</i>	230	25.48	9.12	Nucl	rna-Chr4A_Cda20735.2	<i>CdWRKY67</i>	336	37.30	6.33	Pero
rna-Chr1A_Cda13442.2	<i>CdWRKY3</i>	199	20.72	10.59	Nucl	rna-Chr4A_Cda20735.1	<i>CdWRKY68</i>	373	41.82	7.57	Pero
rna-Chr1A_Cda15271.1	<i>CdWRKY4</i>	371	39.74	5.17	Nucl	rna-Chr4A_Cda20787.1	<i>CdWRKY69</i>	346	37.46	9.88	Nucl
rna-Chr1B_Cda11922.1	<i>CdWRKY5</i>	475	50.09	5.82	Nucl	rna-Chr4A_Cda21010.2	<i>CdWRKY70</i>	492	51.90	8.13	Nucl
rna-Chr1B_Cda13010.1	<i>CdWRKY6</i>	259	27.33	9.73	Nucl	rna-Chr4B_Cda18668.1	<i>CdWRKY71</i>	356	38.64	6.63	Pero
rna-Chr1B_Cda13952.1	<i>CdWRKY7</i>	409	43.94	5.65	Nucl	rna-Chr4B_Cda19016.1	<i>CdWRKY72</i>	390	41.58	9.18	Nucl
rna-Chr1B_Cda15301.1	<i>CdWRKY8</i>	347	37.83	8.44	Nucl	rna-Chr4B_Cda19255.1	<i>CdWRKY73</i>	425	45.80	6.42	Nucl
rna-Chr2A_Cda07705.1	<i>CdWRKY9</i>	402	43.64	9.35	Chlo	rna-Chr4B_Cda20045.2	<i>CdWRKY74</i>	341	37.16	10.14	Nucl
rna-Chr2A_Cda08362.1	<i>CdWRKY10</i>	560	60.09	5.73	Nucl	rna-Chr4B_Cda20759.1	<i>CdWRKY75</i>	327	33.96	5.68	Nucl
rna-Chr2A_Cda08362.2	<i>CdWRKY11</i>	616	66.65	5.99	Chlo	rna-Chr4B_Cda20836.1	<i>CdWRKY76</i>	223	24.22	8.62	Nucl
rna-Chr2A_Cda09029.2	<i>CdWRKY12</i>	386	41.71	7.55	ER	rna-Chr5A_Cda28719.1	<i>CdWRKY77</i>	525	54.57	6.22	Nucl
rna-Chr2A_Cda09029.1	<i>CdWRKY13</i>	309	33.28	6.32	Nucl	rna-Chr5A_Cda29105.1	<i>CdWRKY78</i>	199	21.89	6.52	Nucl
rna-Chr2A_Cda09065.1	<i>CdWRKY14</i>	123	13.61	9.61	Nucl	rna-Chr5A_Cda29468.1	<i>CdWRKY79</i>	394	42.00	6.84	Nucl
rna-Chr2A_Cda09219.1	<i>CdWRKY15</i>	369	39.48	5.90	Nucl	rna-Chr5A_Cda29470.2	<i>CdWRKY80</i>	318	34.32	6.95	Mito
rna-Chr2A_Cda09220.1	<i>CdWRKY16</i>	422	44.26	4.89	Nucl	rna-Chr5A_Cda29510.1	<i>CdWRKY81</i>	257	63.88	5.04	Nucl
rna-Chr2A_Cda11034.1	<i>CdWRKY17</i>	357	37.59	6.17	Nucl	rna-Chr5A_Cda30270.1	<i>CdWRKY82</i>	291	31.35	4.71	Nucl
rna-Chr2B_Cda08051.1	<i>CdWRKY18</i>	525	56.55	5.47	Nucl	rna-Chr5A_Cda30271.1	<i>CdWRKY83</i>	198	22.12	5.96	Chlo
rna-Chr2B_Cda08409.1	<i>CdWRKY19</i>	266	28.94	6.15	Nucl	rna-Chr5A_Cda30272.1	<i>CdWRKY84</i>	285	31.14	4.96	Nucl
rna-Chr2B_Cda08410.1	<i>CdWRKY20</i>	311	33.42	6.66	Chlo	rna-Chr5A_Cda30273.1	<i>CdWRKY85</i>	275	30.45	7.68	Nucl
rna-Chr2B_Cda08664.2	<i>CdWRKY21</i>	388	41.70	8.14	Nucl	rna-Chr5A_Cda30645.1	<i>CdWRKY86</i>	236	24.59	6.49	Nucl
rna-Chr2B_Cda08863.1	<i>CdWRKY22</i>	372	39.78	6.15	Cyto	rna-Chr5A_Cda30840.1	<i>CdWRKY87</i>	684	72.43	8.70	Nucl
rna-Chr2B_Cda10763.1	<i>CdWRKY23</i>	624	65.48	6.88	Nucl	rna-Chr5A_Cda30936.1	<i>CdWRKY88</i>	295	31.36	7.27	Nucl
rna-Chr3A_Cda00837.1	<i>CdWRKY24</i>	322	34.08	7.51	Nucl	rna-Chr5B_Cda28320.1	<i>CdWRKY89</i>	202	21.74	5.64	Chlo
rna-Chr3A_Cda00987.1	<i>CdWRKY25</i>	284	30.35	6.25	Nucl	rna-Chr5B_Cda28323.1	<i>CdWRKY90</i>	283	30.48	5.99	Nucl
rna-Chr3A_Cda00989.1	<i>CdWRKY26</i>	326	36.18	5.56	Chlo	rna-Chr5B_Cda29072.1	<i>CdWRKY91</i>	545	58.40	6.07	Nucl
rna-Chr3A_Cda00992.1	<i>CdWRKY27</i>	256	28.89	5.72	Nucl	rna-Chr5B_Cda29085.1	<i>CdWRKY92</i>	169	19.07	8.50	Chlo
rna-Chr3A_Cda00993.2	<i>CdWRKY28</i>	253	28.41	6.41	Nucl	rna-Chr5B_Cda29086.1	<i>CdWRKY93</i>	316	34.69	4.87	Nucl
rna-Chr3A_Cda01390.1	<i>CdWRKY29</i>	313	33.79	5.07	Nucl	rna-Chr5B_Cda29387.1	<i>CdWRKY94</i>	223	23.98	9.05	Nucl
rna-Chr3A_Cda01390.2	<i>CdWRKY30</i>	357	38.47	5.26	Nucl	rna-Chr5B_Cda29621.1	<i>CdWRKY95</i>	405	42.80	6.79	Nucl
rna-Chr3A_Cda01486.1	<i>CdWRKY31</i>	238	25.56	8.65	Nucl	rna-Chr5B_Cda29653.1	<i>CdWRKY96</i>	324	35.42	5.16	Nucl
rna-Chr3A_Cda01497.1	<i>CdWRKY32</i>	316	32.52	5.31	Nucl	rna-Chr5B_Cda29738.1	<i>CdWRKY97</i>	298	32.70	5.15	Nucl
rna-Chr3A_Cda01594.2	<i>CdWRKY33</i>	155	17.72	9.30	Cyto	rna-Chr6A_Cda18172.1	<i>CdWRKY98</i>	234	25.68	8.58	Nucl
rna-Chr3A_Cda01878.1	<i>CdWRKY34</i>	377	39.65	6.50	Nucl	rna-Chr6A_Cda18545.1	<i>CdWRKY99</i>	304	32.05	10.09	Nucl
rna-Chr3A_Cda02095.2	<i>CdWRKY35</i>	344	37.30	6.54	Nucl	rna-Chr6B_Cda16336.1	<i>CdWRKY100</i>	326	34.72	9.39	Nucl
rna-Chr3A_Cda02101.3	<i>CdWRKY36</i>	249	26.63	10.00	Nucl	rna-Chr6B_Cda17069.1	<i>CdWRKY101</i>	243	26.77	5.96	Pero
rna-Chr3A_Cda02101.1	<i>CdWRKY37</i>	363	38.75	7.70	Nucl	rna-Chr6B_Cda17070.1	<i>CdWRKY102</i>	288	32.06	5.74	Nucl
rna-Chr3A_Cda02749.2	<i>CdWRKY38</i>	314	34.53	7.48	Nucl	rna-Chr6B_Cda17189.1	<i>CdWRKY103</i>	710	75.49	7.97	Nucl
rna-Chr3A_Cda02749.1	<i>CdWRKY39</i>	277	30.33	6.25	Nucl	rna-Chr6B_Cda17602.2	<i>CdWRKY104</i>	168	19.29	9.57	Mito
rna-Chr3A_Cda02750.1	<i>CdWRKY40</i>	289	33.04	6.10	Nucl	rna-Chr6B_Cda17602.3	<i>CdWRKY105</i>	200	21.98	9.15	Cyto
rna-Chr3A_Cda02751.1	<i>CdWRKY41</i>	226	25.18	9.30	Nucl	rna-Chr6B_Cda17915.1	<i>CdWRKY106</i>	476	50.41	5.83	Nucl
rna-Chr3A_Cda03116.3	<i>CdWRKY42</i>	354	37.91	9.96	Nucl	rna-Chr7A_Cda23931.1	<i>CdWRKY107</i>	659	70.92	6.57	Nucl
rna-Chr3A_Cda03523.1	<i>CdWRKY43</i>	483	51.70	8.16	Nucl	rna-Chr7A_Cda23931.5	<i>CdWRKY108</i>	361	39.90	6.28	Nucl
rna-Chr3A_Cda03953.1	<i>CdWRKY44</i>	278	30.97	4.87	Nucl	rna-Chr7A_Cda25853.1	<i>CdWRKY109</i>	340	35.72	6.38	Nucl
rna-Chr3A_Cda04633.4	<i>CdWRKY45</i>	424	43.41	9.30	Chlo	rna-Chr7A_Cda25853.3	<i>CdWRKY110</i>	282	31.14	9.89	Nucl
rna-Chr3B_Cda00028.1	<i>CdWRKY46</i>	342	38.07	5.53	Nucl	rna-Chr7B_Cda22398.1	<i>CdWRKY111</i>	329	34.25	8.47	Nucl
rna-Chr3B_Cda00937.1	<i>CdWRKY47</i>	549	59.11	6.20	Nucl	rna-Chr7B_Cda23014.5	<i>CdWRKY112</i>	338	37.04	5.61	ER
rna-Chr3B_Cda00969.1	<i>CdWRKY48</i>	282	29.85	5.98	Nucl	rna-Chr8A_Cda05899.1	<i>CdWRKY113</i>	185	45.38	5.16	Nucl
rna-Chr3B_Cda00970.1	<i>CdWRKY49</i>	284	30.50	5.81	Nucl	rna-Chr8A_Cda07097.1	<i>CdWRKY114</i>	187	20.72	6.02	Nucl
rna-Chr3B_Cda00973.1	<i>CdWRKY50</i>	308	33.57	5.08	Nucl	rna-Chr8B_Cda05779.1	<i>CdWRKY115</i>	358	39.22	5.05	Nucl
rna-Chr3B_Cda01582.1	<i>CdWRKY51</i>	201	21.89	8.81	Chlo	rna-Chr8B_Cda05780.1	<i>CdWRKY116</i>	336	37.17	5.70	Chlo
rna-Chr3B_Cda01911.1	<i>CdWRKY52</i>	384	40.92	6.55	Nucl	rna-Chr8B_Cda05781.1	<i>CdWRKY117</i>	159	16.93	9.46	Mito
rna-Chr3B_Cda02062.1	<i>CdWRKY53</i>	207	23.35	9.36	Nucl	rna-Chr8B_Cda05781.4	<i>CdWRKY118</i>	225	25.07	9.41	Nucl
rna-Chr3B_Cda02299.1	<i>CdWRKY54</i>	348	36.98	9.21	Nucl	rna-Chr8B_Cda05782.1	<i>CdWRKY119</i>	290	33.29	6.94	Nucl
rna-Chr3B_Cda02308.1	<i>CdWRKY55</i>	253	28.02	9.83	Nucl	rna-Chr8B_Cda05783.1	<i>CdWRKY120</i>	283	32.55	5.65	Nucl
rna-Chr3B_Cda03770.1	<i>CdWRKY56</i>	277	30.63	4.94	Nucl	rna-Chr8B_Cda05784.1	<i>CdWRKY121</i>	340	37.38	5.43	Pero
rna-Chr3B_Cda04472.1	<i>CdWRKY57</i>	633	67.29	7.79	Nucl	rna-Chr8B_Cda05792.1	<i>CdWRKY122</i>	565	62.83	5.66	Nucl
rna-Chr3B_Cda04556.1	<i>CdWRKY58</i>	228	24.90	6.29	Nucl	rna-Chr9A_Cda26548.2	<i>CdWRKY123</i>	236	26.25	8.78	Nucl
rna-Chr3B_Cda04557.1	<i>CdWRKY59</i>	492	50.94	8.31	Nucl	rna-Chr9A_Cda26593.1	<i>CdWRKY124</i>	782	90.34	6.45	Nucl
rna-Chr3B_Cda04580.1	<i>CdWRKY60</i>	257	27.71	9.86	Chlo	rna-Chr9A_Cda26775.1	<i>CdWRKY125</i>	303	31.83	10.23	Nucl
rna-Chr3B_Cda05608.1	<i>CdWRKY61</i>	535	56.68	6.35	Nucl	rna-Chr9A_Cda26930.1	<i>CdWRKY126</i>	614	66.16	5.49	Cyto
rna-Chr4A_Cda19970.1	<i>CdWRKY62</i>	318	33.25	6.18	Nucl	rna-Chr9A_Cda27238.1	<i>CdWRKY127</i>	295	31.95	6.04	Nucl
rna-Chr4A_Cda20100.1	<i>CdWRKY63</i>	389	42.01	10.05	Nucl	rna-Chr9A_Cda27858.1	<i>CdWRKY128</i>	675	73.53	6.51	Nucl
rna-Chr4A_Cda20609.1	<i>CdWRKY64</i>	130	13.87	8.55	Nucl	rna-Chr9B_Cda25562.1	<i>CdWRKY129</i>	501	54.35	6.07	Nucl
rna-Chr4A_Cda20609.3	<i>CdWRKY65</i>	81	8.53	8.69	Nucl						

2.3 *CdWRKYs* 基因家族成员的系统发育树分析

根据Eulgem等^[9]对拟南芥WRKY家族分组的定义,与拟南芥WRKY构建系统发育树。将所有鉴定出的*CdWRKYs*分为三大类,分别对应拟南芥中的groupI、groupII和groupIII(图2)。17个*CdWRKYs*转录因子含有两个WRKY结构域,被归为groupI;含有一个WRKY结构域的*CdWRKY*蛋白被归为groupII(65个)或者groupIII(47个)。此外,groupII的WRKY成员可进一步聚类为5个亚族(IIa-IIe),其中5个WRKY蛋白属于IIa,9个属于IIb,23个属于IIc,14个属于IIc,14个属于IIe。在groupII的*CdWRKYs*成员中,IIc成员最多,IIa包含基因较少。对狗牙根与其他植物WRKY基因家族数量进行对比,发现狗牙根WRKY转录因子129个,高于拟南芥和水稻,与二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)相类似,且II亚族的数量较多,占总数量的50%(图3)。

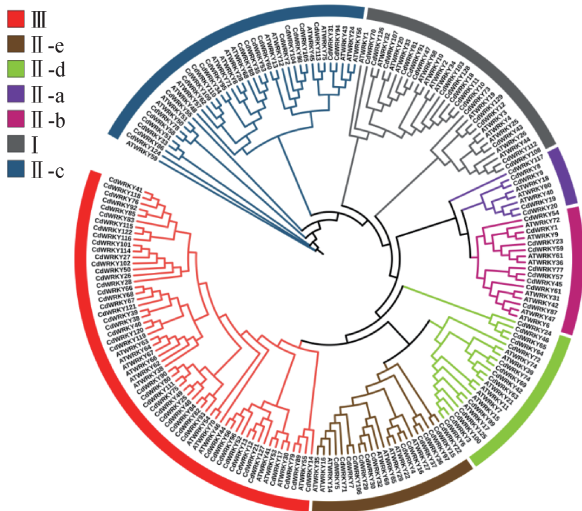


图2 狗牙根与拟南芥WRKY基因家族系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of WRKY gene family in bermudagrass and *Arabidopsis thaliana*

2.4 *CdWRKYs* 基因家族成员的 motif 分析和基因结构分析

利用MEME工具分析狗牙根WRKY蛋白的保守基序,结果表明,*CdWRKYs*蛋白序列中共包括10个保守motif,其基因家族成员motif数量一般为1~8个。其中*CdWRKY114*、*CdWRKY3*、*CdWRKY126*和*CdWRKY60*的motif数量最少,而*CdWRKY128*和*CdWRKY108*的motif数量最多,均为8个。所有狗牙根WRKY蛋白序列中均有motif1,表明这个基序是狗牙根WRKY基因家族进化的主要组成部分。并且motif1只在*CdWRKY114*、*CdWRKY3*、*CdWRK*

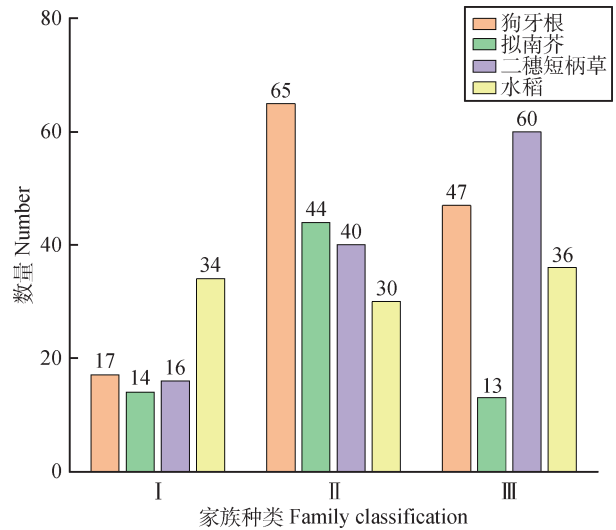


图3 狗牙根与其他植物WRKY转录因子基因数量比较

Fig. 3 Comparison of the number of WRKY transcription factor genes between bermudagrass and other plants

Y126、*CdWRKY129*、*CdWRKY43*、*CdWRKY60*、*CdWRKY14*和*CdWRKY99*中没有出现,motif9出现在29个*CdWRKYs*成员中,motif10出现在14个*CdWRKY*成员中,其余*CdWRKYs*基因家族成员大多数含有相同的motif,说明*CdWRKYs*基因家族成员功能具有相似性。

利用TBtools将狗牙根*CdWRKYs*的基因结构可视化,发现,*CdWRKYs*中外显子的数目为1~7个,其中有63个成员只含有1个内含子,60个成员含有2个内含子,33个成员含有3个内含子(图4),内含子丰富的*CdWRKYs*基因家族成员进化较快,基因内含子丢失速度往往较快,含有3个内含子的33个成员可能是*CdWRKYs*基因家族原始基因。

2.5 *CdWRKYs* 基因家族成员的共线性分析

基因复制对于新基因和新功能的产生十分重要,片段重复和串联重复对基因家族扩展具有重要作用。本研究发现*CdWRKY*家族的129个成员间存在57个片段重复事件(图5),例如染色体上1A的*CdWRKY5*和染色体上2A的*CdWRKY15*二者之间发生了明显的片段重复事件;15个成员间存在8个串联重复事件,例如在染色体1B上的*CdWRKY5*以及*CdWRKY7*基因间存在串联重复事件。表明*CdWRKYs*的进化可能主要依赖于片段重复。对狗牙根WRKY基因与拟南芥、水稻基因的共线性进行分析(图6)。129个*CdWRKYs*基因中有25条与拟南芥基因之间存在共线性关系,有93条与水稻基因

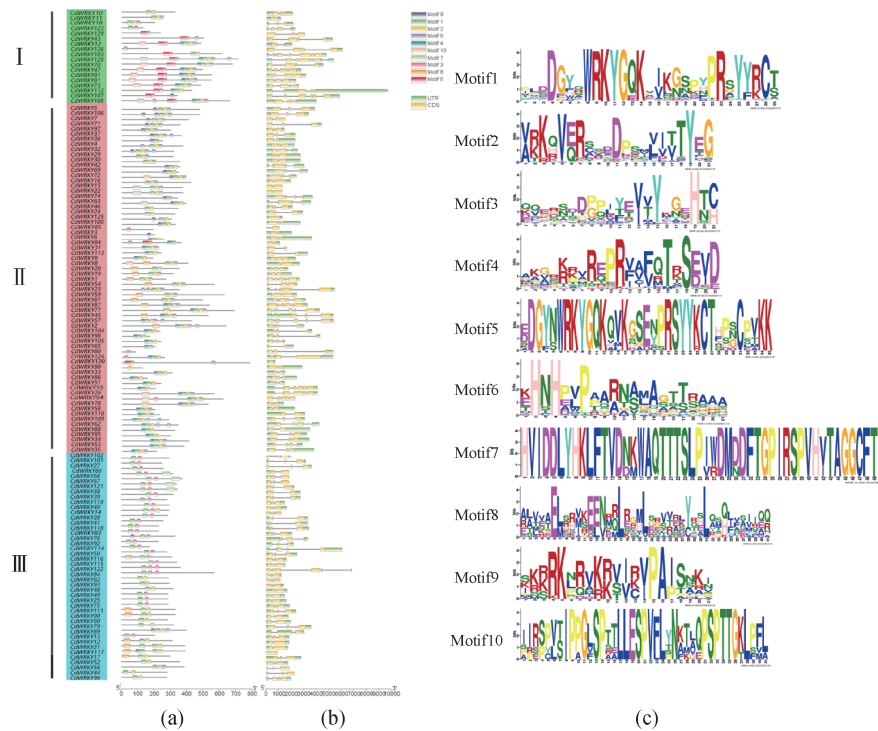


图4 *CdWRKYs* 转录因子保守基序与基因结构分析

Fig. 4 Analysis of conserved domains and conserved motifs of *CdWRKYs* transcription factors

注:图(a)为基因保守基序分析;图(b)为基因结构分布;图(c)为 *CdWRKYs* 家族MEME预测的10个保守位点LOGO图

Note: gene conserved motif analysis (a); the distribution of gene structure (b); LOGO map of 10 conserved loci predicted by MEME of *CdWRKYs* family (c)

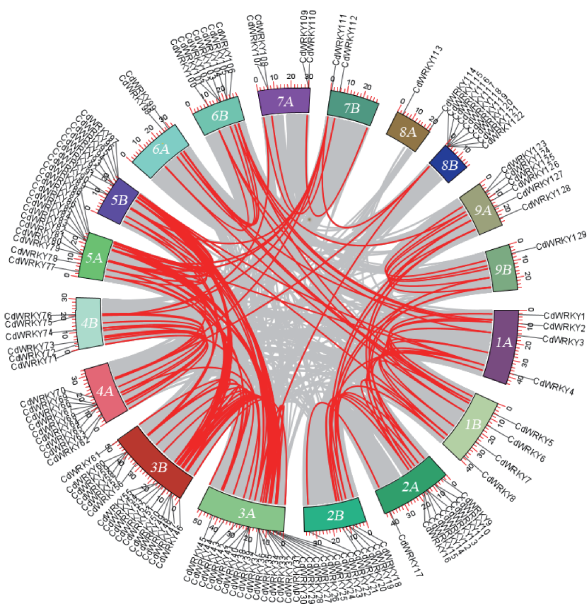


图5 *CdWRKYs* 基因共线性分析

Fig. 5 Collinearity analysis of *CdWRKYs* genes

注:图中灰线表示狗牙根基因组的所有共线性片段,红线表示片段重复的WRKY基因对

Note: The gray line in the figure represents all the collinear fragments of the bermudagrass genome, and the red line represents the WRKY gene pair with repeated fragments

之间存在共线性关系。狗牙根WRKY基因与水稻的共线性关系明显高于与拟南芥的共线性关系,说明狗牙根与水稻的WRKY基因家族有着更密切的进化关系,这些基因可能具有相似的功能。

2.6 *CdWRKYs* 基因家族成员的启动子顺式作用元件分析

提取 *CdWRKYs* 基因上游2000 bp长度为启动子序列,分析存在的顺式作用元件(图7)。结果表明,狗牙根WRKY基因家族成员的启动子中,光响应相关元件数量最多,其次为激素类响应元件,包括生长素、赤霉素、水杨酸、脱落酸等。此外,还存在大量胁迫类响应元件,包括厌氧诱导、干旱诱导、低温响应以及防御和应激反应等元件。每个基因的启动子区域至少包含1种与植物激素应答相关的顺式作用元件,且不同基因启动子区所含激素响应顺式作用元件在数量和种类上均存在差异。这说明 *CdWRKYs* 不仅参与调控植物生长,还在激素信号传导以及植物应对非生物胁迫的各类生理过程中发挥作用。

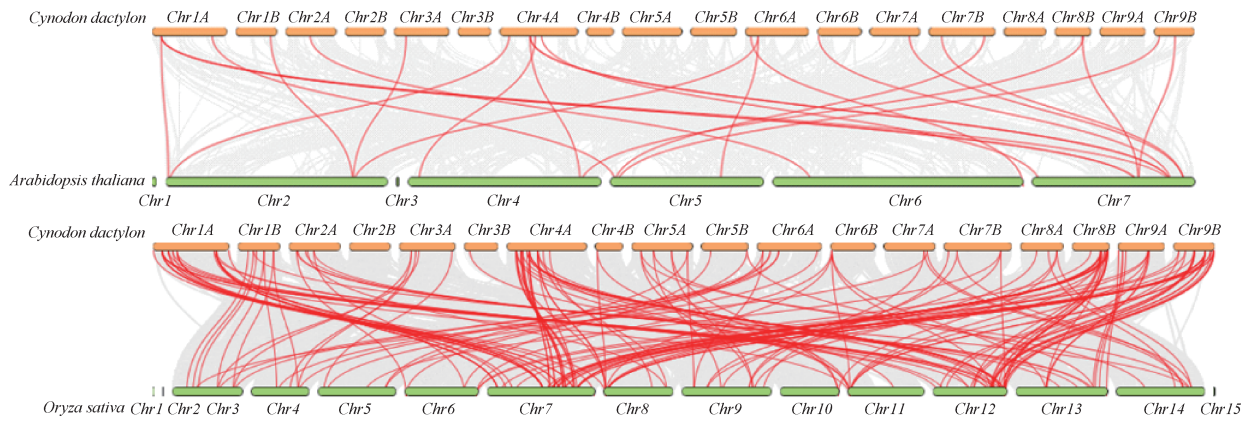


图 6 狗牙根与拟南芥、水稻 WRKY 基因的共线性关系

Fig. 6 Collinear relationship of WRKY genes between bermudagrass and Arabidopsis, Oryza sativa

注:图中灰线表示狗牙根基因组分别与拟南芥和水稻基因组的所有共线性片段,红线表示片段重复的 WRKY 基因对

Note: The gray line in the figure represents all the collinear fragments of the bermudagrass genome with the Arabidopsis and Oryza sativa genomes, respectively, and the red line represents the WRKY gene pairs with repeated fragments

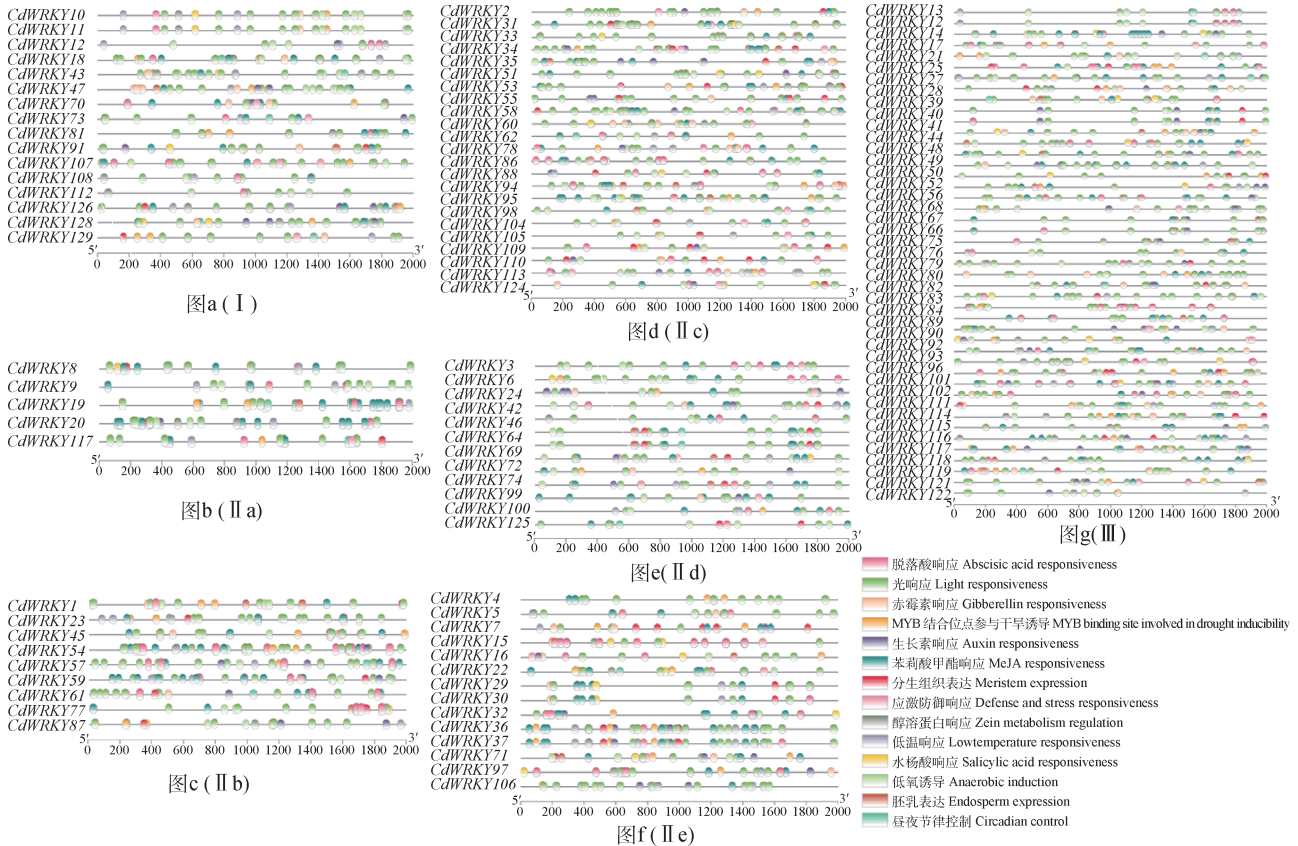
图 7 *CdWRKYs* 基因家族成员启动子顺式作用元件分析

Fig. 7 Promoter cis-acting elements analysis of *CdWRKYs* gene family members

注:图(a)为 I 族顺式作用元件分布;图(b)、(c)、(d)、(e)、(f)为 II 族顺式作用元件分布;图(g)为 III 族顺式作用元件分布

Note: the distribution of group I cis-acting elements(a); the distribution of group II cis-acting elements(b), (c), (d), (e) and (f); the distribution of group III cis-acting elements(g)

2.7 *CdWRKYs* 基因家族组织表达模式分析

基于碱性盐处理 6 d 的转录组数据,筛选出 46 个显著差异表达的 *CdWRKYs* 基因(图 8)。热图聚类分析表明,C14 在中度碱性盐胁迫 6 d 后有 19 个

CdWRKYs 基因表达下调,重度碱性盐胁迫 14 个 *CdWRKYs* 基因表达上调。敏碱 C40 碱性盐胁迫后有 2 个 *CdWRKYs* 基因表达下调;重度碱性盐胁迫 20 个 *CdWRKYs* 基因表达上调。基于各处理下差异

表达及其表达量高低,共筛选出 11 个显著差异表达的 *CdWRKYs* 基因。46 个显著差异基因的 GO 注释的 *CdWRKYs* 基因家族蛋白质序列提供了关于其生物学作用的见解这些作用被广泛分为三类:分子功能、细胞成分和生物过程。分析结果显示(图 9),*CdWRKYs* 基因参与各种分子功能,包括核酸结合、DNA 结合、转录调节活性。生物过程中,*CdWRKYs* 基因主要集中于非生物刺激反应,强调了其在响应非生物胁迫中具有重要作用。

2.8 *CdWRKYs* 基因的表达模式受到碱性盐胁迫的影响

以中度碱性盐、重度碱性盐处理 0, 1, 3, 6, 12, 24, 72 h 的狗牙根叶片为材料,以 11 个显著差异表达的 *CdWRKYs* 基因为候选基因,进行 qRT-PCR 验证(图 10)。C14 狗牙根在中度碱性盐胁迫处理 3 h 时上述候选基因表达量均达峰值后下降,*CdWRKY9* 与 *CdWRKY59* 在 3 h 后表达量呈持续下降趋势;C14 狗牙根在重度碱性盐胁迫下处理 1 h 的表达量达到峰值后下降,*CdWRKY59*、*CdWRKY9* 和 *CdWRKY19* 的表达量呈现持续下降趋势;C40 狗牙根在中度碱性盐胁迫下,*CdWRKY63*、*CdWRKY81* 与 *CdWRKY100* 的表达量呈逐渐上升趋势;C40 狗牙根在重度碱性盐胁迫 3h 时表达量均达到峰值,其中 *CdWRKY5*、

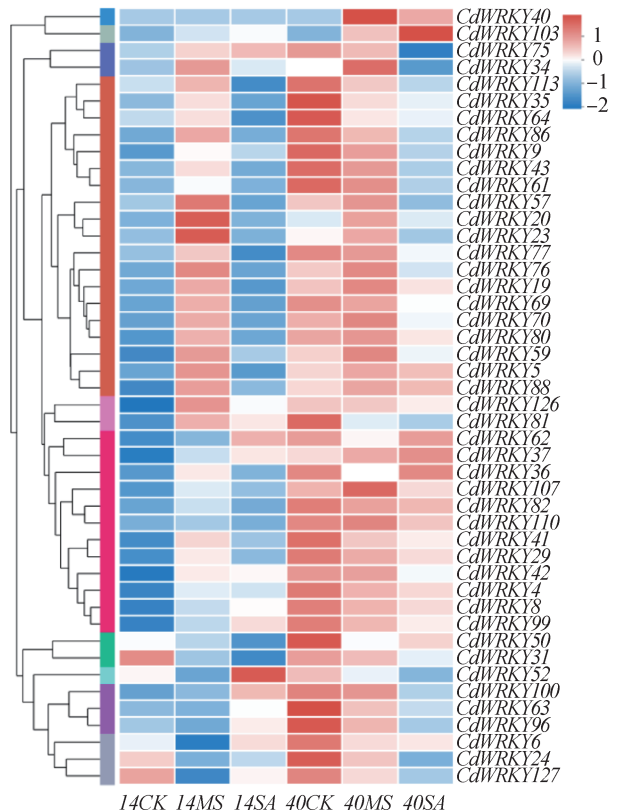


图 8 碱性盐胁迫下 *CdWRKYs* 基因的转录组分析

Fig. 8 Transcriptome analysis of *CdWRKYs* genes under alkaline salt stress

CdWRKY19、*CdWRKY53* 与 *CdWRKY126* 盐胁迫 3h 表达量分别为 CK 的 312.3 倍、103.8 倍、99.6 倍与 255.5 倍,*CdWRKY113* 整体呈上调趋势。

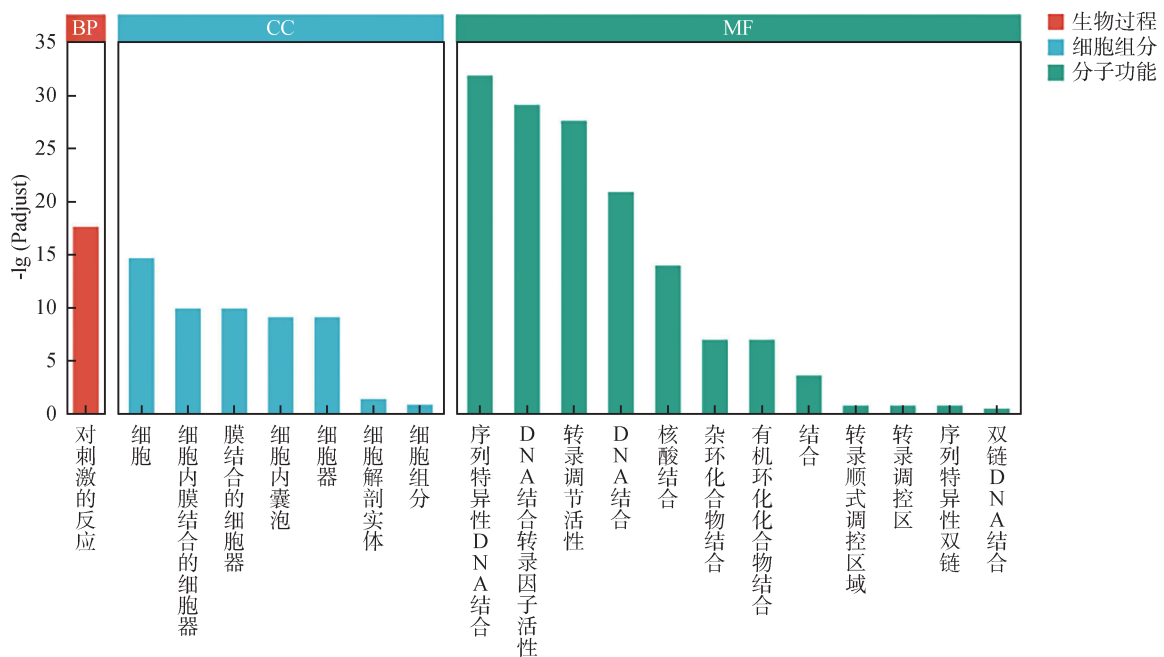


图 9 *CdWRKYs* GO 富集分析

Fig. 9 *CdWRKYs* GO enrichment analysis

为进一步了解狗牙根WRKY基因家族成员的生物学功能,对狗牙根WRKY与拟南芥、水稻耐盐基因的同源性进行分析(图11)。可以看出,*CdWRKY59*、*CdWRKY81*与*CdWRKY126*

与拟南芥、水稻的耐盐基因同源性较高。综上所述,*CdWRKY59*、*CdWRKY81*、*CdWRKY113*与*CdWRKY126*可能是*CdWRKYs*响应碱性盐胁迫的重要候选基因。

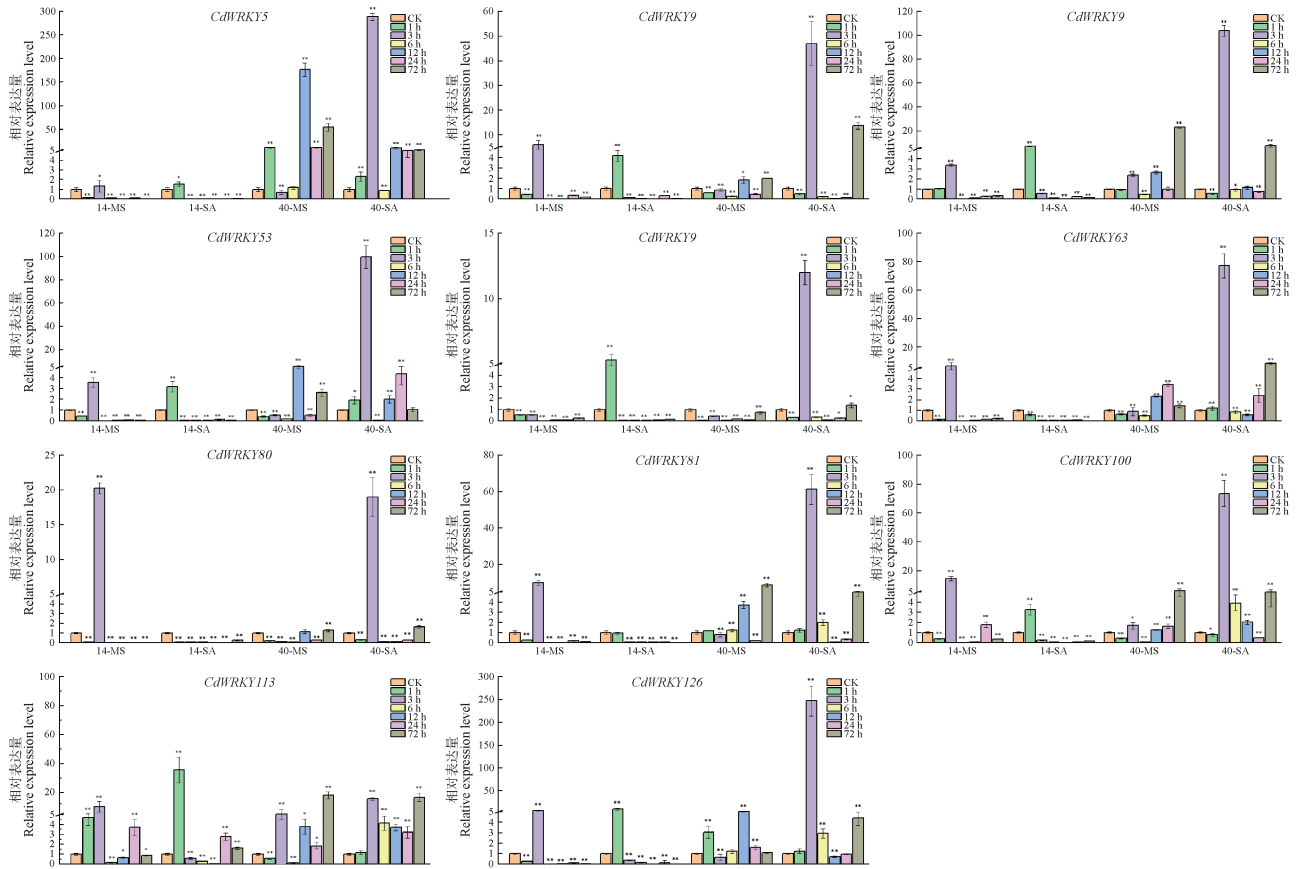


图10 *CdWRKYs*在碱性盐胁迫下的表达量

Fig. 10 Expression of *CdWRKYs* under alkaline salt stress

注:*代表中度或重度盐胁迫下与对照相比基因表达量的差异显著性,*代表 $P < 0.05$,**代表 $P < 0.01$

Note:*represents the significant difference in gene expression between medium or severe salt stress and the control,*represents $P < 0.05$,** represents $P < 0.01$

3 讨论

3.1 *CdWRKYs*基因家族的特征

WRKY转录因子是植物中最大的基因家族之一,大量的研究证明其在植物生长发育以及应对非生物胁迫过程中发挥关键的作用。目前,许多植物的WRKY基因家族成员已得到鉴定,在拟南芥^[9]、水稻^[21]和二穗短柄草^[22]中分别鉴定了74,102以及116个成员。本研究在新疆狗牙根中鉴定出129个WRKY基因成员,这与水稻(102个)与二穗短柄草(116个)中鉴定的WRKY家族成员数量相近,比紫花苜蓿^[23](198个),比拟南芥(71个)与大麦(*Hordeum vulgare*)(98个)^[24]等农作物多。这可能是新

疆狗牙根为四倍体,存在较多同源基因。亚细胞定位预测显示,狗牙根WRKY转录因子大多数定位于细胞核中。这一结果与盐生草(*Halogeton glomeratus*)^[25]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[26]等前人研究一致,表明该类基因主要在细胞核内行使功能。

3.2 *CdWRKYs*基因的进化模式

本研究构建了拟南芥和狗牙根WRKY基因的系统进化树,将*CdWRKYs*分为3大组:Group I(17个成员)、GroupII(65个成员)、GroupIII(47个成员),其中GroupII可分为5个亚组(Group II-a~Group II-e)。通过与拟南芥WRKY基因家族共同构建系统进化树,可以进一步帮助预测狗牙根

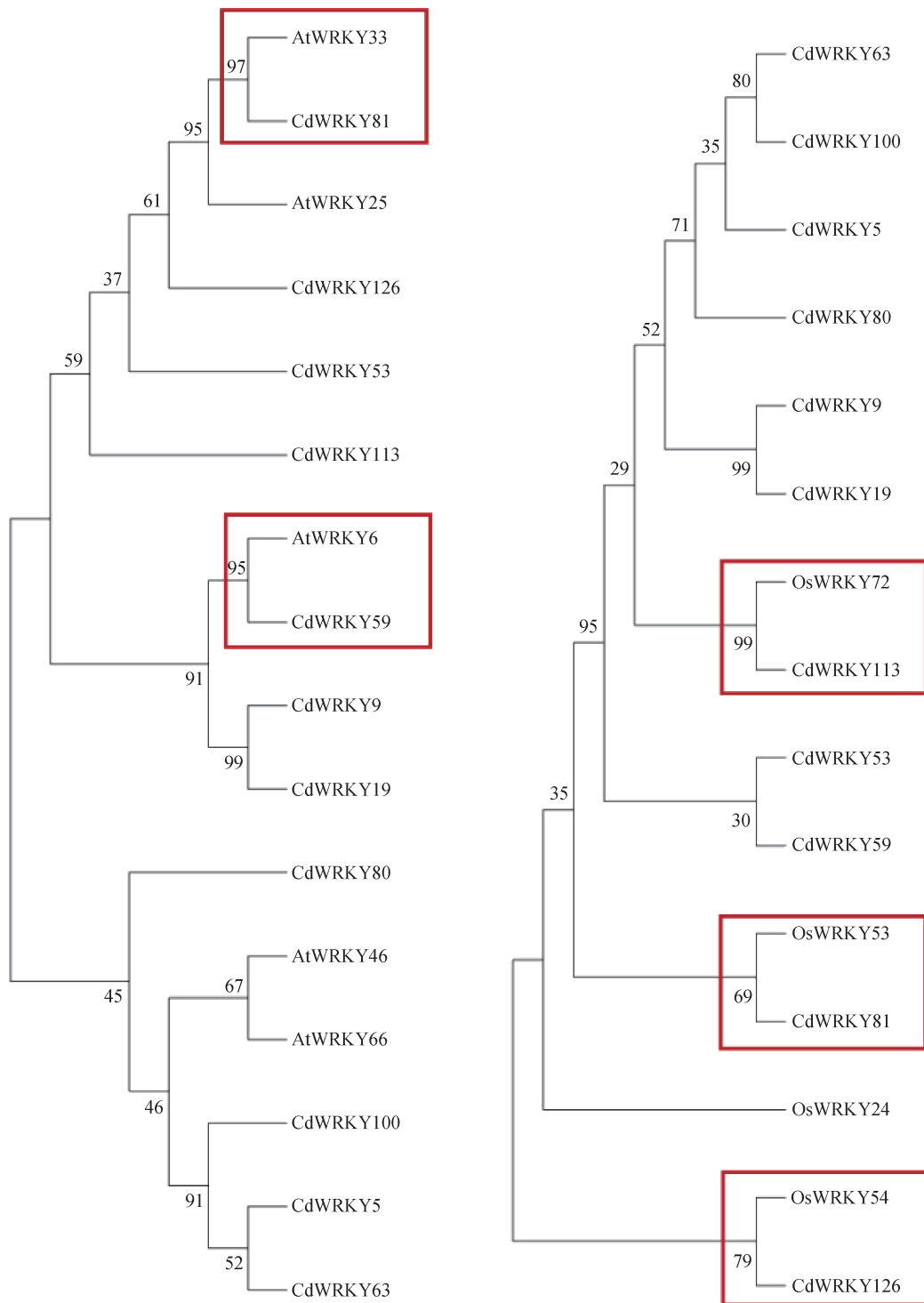


图 11 狗牙根与拟南芥、水稻耐盐相关基因同源性分析

Fig. 11 Homology analysis of salt tolerance related genes in bermudagrass, *Arabidopsis thaliana* and rice

注:红色框表示与水稻或拟南芥耐盐基因同源性高的狗牙根 WRKY 基因

Note: The red box represents the bermudagrass WRKY gene with high homology to salt-tolerant genes in *Oryza sativa* or *Arabidopsis thaliana*

WRKY 基因的功能。进化树显示, Group I 与 Group IIa、Group IIc 较近, 这可能是由于第 I 类 WRKY 可能是先于第 II 和 III 类的 WRKY TFs 出现的, 这主要是因为 II 类和 III 类 WRKY TFs 成员的 C 端结构

域与 I 类是共享的^[27]。已有研究表明拟南芥中的 AtWRKY33 可能在响应高盐胁迫方面起着一定的作用^[28]。通过系统进化树发现 CdWRKY81 与其聚类在一起, 因而推测其可能具有相同的功能作用。

保守基序分析表明,狗牙根 WRKY 家族成员几乎都含有一个保守基序 motif1,推测 motif1 是 *CdWRKY* 家族最保守的 WRKYGQK 基序,与黄连 (*Coptis chinensis*)^[29] 的研究结果一致。可作为后续功能验证的靶向序列。并且同一亚组的 motif 种类及排列顺序高度相似,如 Group II 组中的所有成员均含有 4 或 5 种相同且排列顺序一致的 motif。此外, Motif5 和 Motif10 只存在于特定的分组中,推测该现象是因为 *CdWRKYs* 在进化过程中出现功能分化所致。另外, *CdWRKY* 家族成员含有保守基序的数量为 1~10 个,推测蛋白保守基序和基因结构的差异导致 *CdWRKY* 基因家族成员发挥不同的功能。

基因复制是植物基因家族成员扩增的主要驱动力之一,基因的片段复制和串联复制则是基因复制的两种主要形式^[30]。在富民枳 (*Poncirus polyandra*) 中, WRKY 基因家族存在 4 对串联重复基因和 20 对片段复制基因^[31]。在本研究中,共鉴定出 65 个基因复制事件,涉及 116 个 WRKY 基因,其中有 90 个 WRKY 基因涉及 57 个片段复制事件,16 个 WRKY 基因涉及 8 个串联复制事件,类似现象在金银花 (*Lonicera japonica*)^[32]、假俭草 (*Eremochloa ophiuroides*)^[33] 等植物中有发现,说明在进化过程中,片段复制事件可能是 *CdWRKYs* 基因家族成员的主要扩增方式。

植物可以通过调节激素的产生、分布和信号转导来响应和调节植物的生长和抗胁迫的能力,以促进其在非生物和生物胁迫下的生存^[34]。本研究发现狗牙根 WRKY 基因家族成员的启动子中存在着大量光响应、胁迫响应和激素响应类顺式作用元件,表明其 WRKY 基因可能参与植物胁迫调控网络。

3.3 *CdWRKYs* 生物学功能预测及表达模式分析

转录组数据分析表明,11 个 *CdWRKYs* 基因的表达量在碱性盐胁迫下的狗牙根叶片中表现出明显上调或下调,说明 *CdWRKYs* 基因家族在碱性盐胁迫下狗牙根生长发育过程中表现出功能多样性。GO 富集分析表明,许多 *CdWRKYs* 与调控活性和 DNA 结合因子活性相关,且 *CdWRKYs* 在与盐、干旱、低温和相关的细胞功能中表现出富集,特别是在盐胁迫中响应,特别是 *CdWRKY59*、*CdWRKY81*、*CdWRKY113* 与 *CdWRKY126* 可能是狗牙根 WRKY 基因家族中调控碱性盐胁迫的重要候选基因,而这些基因如何参与碱性盐胁迫下的狗牙根响应有待深入研究。

4 结论

本研究对新疆狗牙根 WRKY 基因家族成员进行了系统的鉴定和分析。共鉴定出 129 个 *CdWRKYs*,它们不均匀地分布在 18 条染色体上。根据系统发育分析,将 *CdWRKYs* 分为 I、II 和 III 共 3 组,其中 II 组又分为 II a~II e5 个亚组。在基因复制方面,相比于基因的串联重复,基因的片段重复是 *CdWRKYs* 基因进化的主要动力。转录组数据分析鉴定出 11 个 *CdWRKYs* 基因中在碱性盐胁迫中表达量较高,qRT-PCR 结果显示, *CdWRKY59*、*CdWRKY81*、*CdWRKY113* 与 *CdWRKY126* 在胁迫下体现出显著差异表达。本研究结果为进一步探索 *CdWRKYs* 的功能奠定了基础,为狗牙根品种的改良和创新提供新思路。

参考文献

- [1] 产祝龙,施海涛,王艳平. 狗牙根抗非生物胁迫的研究进展[J]. 草业科学,2013,30(8):1182-1187
CHAN Z L,SHI H T,WANG Y P. Response of Bermuda grass to abiotic stress[J]. Pratacultural Science,2013,30(8):1182-1187
- [2] 阿不来提,石定燧,杨光,等. 新疆野生狗牙根研究初报[J]. 新疆农业大学学报,1998,21(2):124-127
EI B,SHI D S,YANG G, et al. Preliminary research report on the native Cynodon dactylon in Xinjiang[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University,1998,21(2):124-127
- [3] HARLAN J R, WET J M J D, RAWAL K M. Cytogenetic studies in Cynodon L. C. rich. (Gramineae)[J] East African Agricultural and Forestry Journal, 1970,10(3): 220-226
- [4] 李硕,李培英,李雯,等. 干旱胁迫下不同抗性狗牙根脯氨酸和甜菜碱代谢变化[J]. 中国草地学报,2024,46(8):45-52
LI S,LI P Y,LI W, et al. Effect of drought stress on proline and betaine metabolic pathway in Cynodon dactylon[J]. Chinese Journal of Grassland,2024,46(8):45-52
- [5] 朱生堡,乌尔古丽·托尔逊,唐光木,等. 新疆盐碱地变化及其治理措施研究进展[J]. 山东农业科学,2023,55(3):158-165
ZHU S B,WUERGULI T,TANG G M, et al. Research progress on saline-alkali land changes and its treatment measures in Xinjiang[J]. Shandong Agricultural Sciences,2023,55(3):158-165
- [6] 陈静波,李丹丹,郝东利,等. NaCl胁迫下 pH 值和氮素形态对狗牙根生长及钠钾离子调控的影响[J]. 植物资源与环境学报,2024,33(2):30-40
CHEN J B,LI D D,HAO D L, et al. Effects of pH value and nitrogen form on growth and sodium and potassium ion regulation of Cynodon dactylon under NaCl stress [J]. Journal of Plant Resources and Environment,2024,33(2):30-40
- [7] ISHIGURO S, NAKAMURA K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1 that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato[J]. Molecular and General Genetics MGG,1994,244(6):563-571
- [8] WANG Q S, WANG M H, ZHANG X Z, et al. WRKY gene family evolution in Arabidopsis thaliana [J]. Genetica, 2011,

- 139(8):973-983
- [9] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(5): 199-206
- [10] FLOWERS T J, MUNNS R, COLMER T D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes[J]. Annals of Botany, 2015, 115(3): 419-431
- [11] 王如月, 文武武, 赵恩华, 等. 紫花苜蓿 MsWRKY11 基因的克隆及其耐盐功能分析[J]. 草业学报, 2021, 30(11): 157-169
- WANG R Y, WEN W W, ZHAO E H, et al. Cloning of alfalfa MsWRKY11 gene and analysis of its salt tolerance function[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(11): 157-169
- [12] YU Y A, WU Y X, HE L Y. A wheat WRKY transcription factor TaWRKY17 enhances tolerance to salt stress in transgenic Arabidopsis and wheat plant[J]. Plant Molecular Biology, 2023, 113(4): 171-191
- [13] HUANG S Z, HU L J, ZHANG S H, et al. Rice OsWRKY50 mediates ABA-dependent seed germination and seedling growth, and ABA-independent salt stress tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8625
- [14] SHAO A, XU X, AMOMBO E, et al. CdWRKY2 transcription factor modulates salt oversensitivity in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers][J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1164534
- [15] HUANG X B, AMEE M, CHEN L. Bermudagrass CdWRKY50 gene negatively regulates plants' response to salt stress[J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 188: 104513
- [16] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202
- [17] GUIXIA XU C G. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(4): 1187-1192
- [18] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein - protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D607-D613
- [19] 汤丽斯. 碱性盐胁迫下新疆狗牙根形态、生理及分子响应机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2024: 7-18
- TANG L S. Morphological, physiological and molecular response mechanism of *Cynodon dactylon* in Xinjiang under alkaline salt stress[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2024: 7-18
- [20] TANG L S, YU Q K, LI W, et al. Evaluation and identification of reference genes for qRT-PCR analysis in bermudagrass roots under alkaline salt stress[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2025, 31(5): 729-738
- [21] ROSS C A, LIU Y, SHEN Q J. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(6): 827-842
- [22] 蒋明, 尹龙飞, 张志仙, 等. 二穗短柄草 WRKY 基因家族成员的鉴定和分析[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(6): 1013-1020
- JIANG M, YIN L F, ZHANG Z X, et al. Identification and analysis of WRKY gene family members of *Brachypodium bicolor*[J]. Journal of Triticeae Crops, 2012, 32(6): 1013-1020
- [23] 李显炆, 刘昊, 何飞, 等. 全基因组水平紫花苜蓿 WRKY 转录因子家族鉴定与表达模式分析[J]. 草业学报, 2024, 33(4): 154-170
- LI X Y, LIU H, HE F, et al. Identification and expression pattern of the WRKY transcription factor family in *Medicago sativa*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(4): 154-170
- [24] 毛成志, 王蕾, 孔豆豆, 等. 大麦全基因组 WRKY 基因家族生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(23): 7623-7633
- MAO C Z, WANG L, KONG D D, et al. Bioinformatics analysis of WRKY gene family in barley genome[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(23): 7623-7633
- [25] 陈倩, 徐晓芸, 汪军成, 等. 基于全长转录组的盐生草 WRKY 基因家族的鉴定及其盐胁迫响应模式分析[J]. 草业学报, 2022, 31(12): 146-157
- CHEN Q, XU X Y, WANG J C, et al. Identification of a WRKY gene family based on full-length transcriptome sequences and analysis of response patterns under salt stress in *Halogeton glomeratus*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(12): 146-157
- [26] 水德聚, 孙继, 熊自立, 等. 番茄 WRKY 转录因子比较鉴定及细菌胁迫响应[J]. 福建农业学报, 2023, 38(3): 281-293
- SHUI D J, SUN J, XIONG Z L, et al. Identification and pathogenic response of tomato WRKY transcription factors[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2023, 38(3): 281-293
- [27] CHEN X J, LI C, WANG H, et al. WRKY transcription factors: evolution, binding, and action[J]. Phytopathology Research, 2019, 1(1): 13
- [28] JIANG Y Q, DEYHOLOS M K. Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(1): 91-105
- [29] 刘微, 蒋莉萍, 池玉洁, 等. 黄连 WRKY 基因家族鉴定及表达分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(4): 1369-1380
- LIU W, JIANG L P, CHI Y J, et al. Identification and expression analysis of WRKY gene family in *Coptis chinensis*[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2022, 24(4): 1369-1380
- [30] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, et al. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2004, 4: 10
- [31] 张珊珊, 阮孙美, 杨文忠. 富民枳 WRKY 基因家族的鉴定和干旱胁迫表达分析[J]. 果树学报, 2025, 42(3): 508-525
- ZHANG S S, RUAN S M, YANG W Z. Identification of WRKY gene family and analysis of drought stress expression in *Poncirus Polyandra*[J]. Journal of Fruit Science, 2025, 42(3): 508-525
- [32] 杨教童, 李鹏飞, 肖巧巧. 金银花 WRKY 基因家族的鉴定与功能分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(7): 87-96
- YANG J T, LI P F, XIAO Q Q. Identification and functional analysis of WRKY gene family of *Lonicera japonica* thunb[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2023, 45(7): 87-96
- [33] 于元平, 蒋宇佳, 孙向一, 等. 假俭草 WRKY 基因家族鉴定及其响应干旱胁迫表达分析[J]. 草地学报, 2024, 32(5): 1378-1391
- YU Y P, JIANG Y J, SUN X Y, et al. Identification of the WRKY gene family and analysis of its expression in response to drought stress in centipedegrass[J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(5): 1378-1391
- [34] HE F, ZHANG L X, ZHAO G Q, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the NAC gene family in alfalfa revealed its potential roles in response to multiple abiotic stresses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 10015